

バイオマイクロアレイ用基板およびバイオマイクロアレイ

BACKGROUND OF THE INVENTION

Field of the Invention

本発明は、DNA、ペプチド、タンパク質、多糖類、細胞または組織などのプローブ生体分子がアレイ状に配置されてなるバイオマイクロアレイとそれに用いるバイオマイクロアレイ用基板に関するものである。

Description of the Related Art

近年、バイオマイクロアレイ（バイオチップという場合もある。）は、ゲノム解析に役立ってきたDNAマイクロアレイのみならず、ペプチド、タンパク質、多糖類、細胞または組織などの生体分子を搭載したマイクロアレイに開発対象が拡大している。

バイオマイクロアレイの分析には、高感度である点、多様な標識を入手できる点が評価され、一般に標識として試料に導入された蛍光分子の発光を解析する手法が用いられている。本手法による解析装置としては、共焦点顕微鏡の原理を用いてバイオマイクロアレイを1スポットごとに解析する高精度型の装置や検知機として電荷結合素子アレイなどを用い、ある領域中の複数のスポットを一度に解析する高スループット型の装置などがある。本手法において、データのS/N比を低下させる要因としては、例えば、データ増幅・変換時に発生するノイズ、励起光（入射光）の反射のほか、基板上のチリ、ガラス基板表面処理状態の不均一性、バックグラウンド蛍光などが挙げられる。これらのなかでも基板に起因する精度低下要因としては励起光の反射が挙げられる。

一方、検出されるシグナル強度を高めるためには、励起光が標識である蛍光分子に十分吸収される必要があり、励起光の強度によっては、励起光の反射を抑えることにより解析精度が低下する場合もある。

したがって、励起光の強度に応じて励起光の反射を低減したり高めることのできる基板をユーザーが使い分けられることが望ましいが、現在市販されている基

板は、特に光学処理が施されていないものか、反射を高める機能を有する基板のみであり、励起光の強度によっては十分な解析精度が得られない状況である。

SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、バイオマイクロアレイを用いた種々の解析の精度を向上させるために、蛍光分子のシグナル強度を相対的に高めることができ、また、定量性を向上させることのできるバイオマイクロアレイおよびそれに用いるバイオマイクロアレイ用基板の提供を主目的とするものである。

本発明においては、反射抑制機能を有することを特徴とするバイオマイクロアレイ用基板を提供する。本発明のバイオマイクロアレイ用基板は反射抑制機能を有するので、励起光の反射を抑えて、蛍光分子のシグナル強度を相対的に高めることにより、解析精度を高めることができる。

上記発明においては、基板表面に、反射防止層および光吸収層の少なくとも一方を形成することにより、上記反射抑制機能を有するようにしたものであることが好ましい。励起光の透過率を高めることにより反射を抑制する反射防止層、または励起光を吸収することにより反射を抑制する光吸収層を設けることにより、マイクロアレイ用基板に容易に反射抑制機能を付与することができるからである。

また上記発明においては、上記反射防止層および光吸収層の少なくとも一方が、パターン状に形成されていることが好ましい。反射抑制機能を有する反射防止層や光吸収層をパターン状に形成することにより、反射抑制機能を有する領域を選択することができる。これにより、蛍光分子のシグナル強度を高めると共に、励起光の反射を抑えることが可能となるので、解析精度をさらに向上させることができるからである。

またさらに、上記発明においては、基板表面に、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することが好ましい。基板表面に固定されるプローブ生体分子をより高密度とすることができ、検出精度を向上させることができるからである。

また、上記反射防止層が、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することが好ましく、また上記光吸収層が、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することが好ましい。このように、反射防止層もしくは光吸収層が微細な凹凸

構造または微細な多孔質構造を有するものであれば、基板上に一層このような層を形成することにより、反射抑制効果と基板表面に固定されるプローブ生体分子をより高密度とする効果との両方の効果を得ることができ、容易に検出精度を向上させることができるからである。

上記発明においては、基板上に、プローブ生体分子を固定化するための固定化層がパターン状に形成されてなることが好ましい。プローブ生体分子の拡散を防止し、より高密度に集積することができると共に、不要なプローブ生体分子の吸着を防止して解析精度を更に向上させることができるからである。

また上記発明においては、基板上に位置検知用マークが形成されてなることが好ましい。基板にプローブ生体分子を固定化する場合や、その後の解析過程において、作業性を向上することができ、また、エラー率を低減することができるからである。

本発明はまた、上述したいずれかのバイオマイクロアレイ用基板にプローブ生体分子が固定化されていることを特徴とするバイオマイクロアレイを提供する。本発明のバイオマイクロアレイ用基板を用いてなるバイオマイクロアレイは、蛍光分子のシグナル強度を相対的に高めることができ、また、定量性にも優れているため、高い解析精度が得られるといった効果を有する。

本発明のバイオマイクロアレイ用基板は、反射抑制機能を有するものであるもので、蛍光分子のシグナル強度が相対的に高められ、解析精度の高いバイオマイクロアレイを与えることができる。また、反射抑制機能を付与するために、特定構造の反射防止層、光吸収層または基板表面を用いた場合には、反射抑制機能のみならず、プローブ生体分子を高密度に集積することが可能となり、定量性にも優れたバイオマイクロアレイを与えることができる。さらに、反射抑制機能と反射機能とがパターン状に形成されている場合には、蛍光分子のシグナル強度を高めると共に、不要な励起光の反射を抑えることが可能となるため、バイオマイクロアレイの解析精度をさらに向上させることができる。

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

図1は、本発明のバイオマイクロアレイ用基板の一例を示す模式図である。

図2は、本発明における反射防止層の一例を示す模式図である。

図3は、本発明における反射防止層の他の例を示す模式図である。

DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENT

はじめに、本発明のバイオマイクロアレイ用基板とその製造方法について詳細に説明する。

A. バイオマイクロアレイ用基板

本発明のバイオマイクロアレイ用基板は、反射抑制機能を有することを特徴とするものであり、標識として蛍光分子を用いた場合に、この蛍光分子を励起する励起光の反射を抑えて、蛍光分子のシグナル強度を相対的に高めることができるという利点を有するものである。以下、まずこの反射抑制機能について説明する。

(反射抑制機能)

本発明における反射抑制機能は、例えば、励起光の透過率を高めることにより反射を抑制する方法や、励起光を吸収することにより反射を抑制する方法等により得ることができる。

励起光の透過率を高めることにより反射を抑制する方法としては、一般的には反射防止層を表面に形成する方法を挙げることができるが、基板表面に対し反射防止の機能を有するように加工したものであってもよい。また、励起光を吸収することにより反射を抑制する方法としては、表面に光吸収層を設ける方法や、基板自体が光吸収機能を有するようにする方法であってもよい。

このような反射防止層は、基板のプローブ生体分子が固定される側の表面に形成されてもよく、またその逆側の表面に形成されてもよいが、両側の表面における反射を防止する観点から両側の表面に形成されていることが好ましい。同様に基板表面に反射防止の機能を付与するのは、基板のプローブ生体分子が固定される側の表面であっても、その逆側の表面であってもよく、好ましくは両側の表面に反射抑制の機能が付与されている場合である。

同様に光吸収層も、基板のプローブ生体分子が固定される側の表面に形成されてもよく、またその逆側の表面に形成されてもよいが、その性質上、一般的にはいずれかの表面側に形成されていればよい。また、基板自体が光吸収機能を有す

る場合としては、基板全体が黒色である等、基板全体として光吸収機能を有するものであってもよく、また基板のプローブ生体分子が固定される側の表面もしくはその逆側の表面にのみ光吸収機能が付与されるようにしてもよい。

本発明においては、これらを適宜選択または組み合わせることが可能であり、基板の種類、固定化層の種類等の状況に応じて最も好ましい態様が用いられる。

図1は、上述したような方法により、バイオマイクロアレイ用基板に反射抑制機能を付与した例を示すものである。

図1Aは、基板1上に反射防止膜2が形成され、その上にプローブ生体分子を固定化するための固定化層3が形成された例を示すものであり、図1Bは、基板1上に光吸収層4が形成され、その上に固定化層3が形成された例を示すものである。いずれも、基板のプローブ生体分子が固定される側の表面に形成された例である。

一方、図1Cは、基板1の両側の表面に反射防止層2が形成されており、一方の反射防止層2上に固定化層3が形成された例を示すものである。また図1Dは、基板1のプローブ生体分子が固定される側の表面に反射防止層2が形成され、その表面に固定化層3が積層され、基板1の逆側の表面には光吸収層4が形成された例を示すものである。

本発明においては、このように基板1のプローブ生体分子が固定される側の表面に反射防止層2が形成された場合は、他方の表面からの反射を抑制する必要があることから、他方の表面に反射防止層2もしくは光吸収層4を形成することが好ましい。

また、上記各層の間には種々の機能を有する層が形成されていても良く、例えば、密着性を上げるための接着層が形成されていても良い。反射防止層2および光吸収層4は、単一の層からなるものであっても良く、複数の層からなるものであっても良い。特に、反射防止層2が複数の層からなる場合には、通常、低屈折率層と高屈折率層とが交互に積層して構成される。

次に、このような反射抑制機能を有する領域（以下、反射抑制機能領域とする場合がある。）について説明する。

本発明においては、このような反射抑制機能領域が、基板全面にわたって形成

されていてもよいが、より高い検出精度を得るために、パターン状に形成されていてもよい。なお、ここで反射抑制機能領域は、上述した種々の組み合わせにおけるいずれの態様であつてもよく、これをパターン状に形成するとは、例えば反射防止層や光吸収層をパターン状に形成したものや、上述した例に示すような基材の両側の表面に形成された反射防止層がパターン状に形成されたもの等を例示として挙げることができる。

本発明における反射抑制機能領域のパターンとしては、プローブ生体分子が固定される領域（以下、プローブ生体分子固定領域とする場合がある。）以外の領域のみに形成する態様と、プローブ生体分子固定領域のみに形成する態様とがある。励起光を照射しつつ標識の蛍光を検出する際、励起光が基板全面に照射されている場合は、プローブ生体分子固定領域以外の領域のみに形成する態様であることが好ましい。このような場合は、プローブ生体分子固定領域以外の領域における励起光の反射が検出精度を低下させる要因となるからである。一方、プローブ生体分子固定領域のみに励起光が照射される場合は、反射抑制機能領域がプローブ生体分子固定領域のみにパターンニングされていることが好ましい。励起光の反射が問題となるのはプローブ生体分子固定領域となるからである。

本発明においてはさらに、上記反射抑制機能領域がプローブ生体分子固定領域以外の領域のみに形成する態様である場合、プローブ生体分子固定領域が励起光を反射する機能を有する反射機能領域とすることができる。このようにすることにより、励起光の照射の際に励起光の反射光による検出精度を低下させることができると共に、プローブ生体分子固定領域では励起光が反射されることにより、標識としての蛍光分子が励起されやすくなるという利点を有する。また、蛍光も反射することにより、標識としての蛍光分子が発光した際、基板側に向かった蛍光を反射することにより、より蛍光の検出が容易となり、検出精度を向上させることができるからである。

ここでこの反射機能領域は、励起光および標識の蛍光を反射する機能を有する領域であれば特に限定されるものではない。具体的には、基板上に反射層を形成する方法等により形成される。

このように、プローブ生体分子固定領域を反射機能領域とし、プローブ生体分

子固定領域以外の領域を反射抑制機能領域とする方法としては、例えば基板の生体高分子を固定する側の表面に反射層をパターンニングして反射機能領域を形成し、逆側の表面に光吸収層をパターンニングすることにより反射抑制機能領域を形成するようにし、この際同じフォトリソマスクを用い、一方をポジ型フォトリソレジストでパターンニングし、他方をネガ型フォトリソレジストでパターンニングする方法等を挙げることができる。

(微細な凹凸構造または微細な多孔質構造)

本発明において、さらに標識として用いられる蛍光の検出精度を向上させるために、基材のプローブ生体分子を固定する側の表面に微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を設けることが好ましい。

このように微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することにより、プローブ生体分子を固定する表面の表面積を大幅に増加させることが可能となり、表面上は同一の領域であっても、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を形成することにより、より多くのプローブ生体高分子を固定させることが可能となるので、検出精度を大幅に向上させることができるのである。

このような微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造は、少なくとも上述したプローブ生体分子固定領域に形成されていればよく、したがってプローブ生体分子固定領域のみにパターン状に形成されていてもよく、また全面に形成されていてもよい。

本発明においては、中でも上記反射防止層または光吸収層が微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造を有するものであることが好ましい。このような構造とすることにより、反射防止層または光吸収層を形成することによる検出精度向上効果と微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造を設けることによる検出精度向上効果との両者の効果により、飛躍的に検出精度が向上するからである。

このように反射防止層または光吸収層が微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造を有する場合も、基板の片面に形成されていても良いし、基板の両面に形成されていても良い。しかしながら、片面に形成される場合には、プローブ生体分子を高密度に集積する観点から、プローブ生体分子が固定化される側に形成されていることが好ましい。

(反射防止層)

本発明に用いられる反射防止層は、励起光の透過率が高いものであれば特に限定されるものではないが、屈折率が基板より小さく、反射を防止するのに十分な厚さを有していることが好ましい。

本発明において、反射防止層は平坦構造であってもよいが、上述したように微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造を有するものであることが好ましい。

平坦構造を有する反射防止層としては、通常の低屈折率を有する材料を成膜したものや、上述したように低屈折率層と高屈折率層とを積層したもの等を挙げることができる。

このような平坦構造である反射防止層の材料としては、低屈折率層としては酸化珪素等を挙げることができ、高屈折率層としては酸化二オプ、 Ti 酸化物、酸化ジルコニウム、 ITO 等が挙げられる。

このような平坦な反射防止層の形成方法は、特に限定されるものではなく通常行われる方法により形成され、真空蒸着法、スパッタリング法、 CVD 法等の乾式法や、塗布法等を挙げることができる。

一方、反射防止層が微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造を有するものである場合の例を図2および図3を用いて説明する。

図2AおよびBは、基板1上に形成された微細な凹凸構造を有する反射防止層2の一例を示す模式図である。このように微細な凹凸構造は、平坦な膜をエッチング等により凹凸を形成したものであってもよく、また種々の形状の微粒子を一層配置して形成されたものであっても良い。

また、複数の互いに非相溶のポリマーがそれらの共通溶媒に溶けたコーティング液を基板に塗布し、乾燥して相分離膜を形成した後に、一方のポリマーが溶け他方のポリマーが溶けない溶媒で処理することにより凹凸を形成したものであっても良い（参考資料：Walheimら、Science、第283巻、520ページ、1999年）。さらに、スパッタリング法、物理蒸着（ PVD ）法、化学蒸着法（ CVD ）法、ゾルゲルコーティング法などの一般的な手法によっても凹凸構造を有する反射防止層を形成することが可能である。なお、特に、基材がプラスチック類の場合はエンボス加工（インプリント加工）により反射防止性の凹凸構造を形

成することができる。また、特に基材がアルミナの場合や、表面にアルミナ層が形成されたアルミニウム、シリコンの場合は、ポーラスアルミナやポーラスシリコンを作製する公知の手法を応用することにより反射防止層を形成することも可能である。

図3AおよびBは、基板1上に形成された微細な多孔質構造を有する反射防止層2の一例を示す模式図である。このように微細な多孔質構造は、多孔質層を用いたものであっても良く、種々の形状の微粒子を複数層積層して形成されるものであっても良い。

まず、微細な凹凸構造について説明する。本発明に用いられる微細な凹凸構造は、上述したように平坦な層をエッチング等により凹凸を形成したものや、微粒子を一層配置したものを挙げることができる。

微粒子を用いて微細な凹凸構造とする場合は、その平均粒径は、50nm以上300nm以下が望ましく、70nm以上250nm以下がさらに望ましい。反射防止層として機能を発揮するためには、上述した範囲内とすることが好ましいからである。なお、ここで粒径としたが、微粒子が球形のものに限定されないことは言うまでもない。

上記平均粒径は、電子顕微鏡像より、個々の粒径を計測し、それらの値の平均値を平均粒径として規定した。また、特に用いた原料がコロイド状の場合には、光散乱法などのコロイド科学的粒径測定法により上記平均粒径を求めた。

ここで用いることができる微粒子としては、可視光域において透明な微粒子であり、かつ微粒子層を形成した際にバルクの屈折率として基材の屈折率より小さい屈折率とすることができる微粒子であれば特に限定されるものでない。

具体的に用いることができる無機材料の微粒子としては、 MgF_2 （屈折率1.38）、 SiO_2 （屈折率1.46）、 AlF_3 （屈折率1.33～1.39）、 CaF_2 （屈折率1.44）、 LiF （屈折率1.36～1.37）、 NaF （屈折率1.32～1.34）、 ThF_4 （屈折率1.45～1.5）などの微粒子が挙げられる。

また、有機材料の微粒子としては、ポリマー類の微粒子を挙げることができ、具体的には、架橋アクリル微粒子（例えば、綜研化学（株）製のMXシリーズ、

MRシリーズ)、非架橋アクリル微粒子(例えば、綜研化学(株)製のMPシリーズ)、架橋ポリスチレン微粒子(例えば、綜研化学(株)製のSGPシリーズ)、非架橋ポリスチレン微粒子、架橋度の高い単分散ポリメチルメタクリレート微粒子(例えば、綜研化学(株)製のMSシリーズ、Mシリーズ)、これらの複合化微粒子、官能基導入微粒子等の微粒子を挙げることができる。

本発明においては、上記微粒子の材料の内、シリカ(SiO_2)微粒子もしくはポリマー類の微粒子を用いることが好ましい。

一方、平坦な層を形成しこれをエッチング等により凹凸を形成することにより微細な凹凸を有する反射防止層とする場合、凹凸構造の深さは、 $80\text{ nm} \sim 250\text{ nm}$ であることが好ましく、より好ましくは $90\text{ nm} \sim 200\text{ nm}$ 、さらに好ましくは $100\text{ nm} \sim 180\text{ nm}$ の範囲内である。入射光の散乱を防止するためには、上述した範囲内であることが好ましい。また、凹凸のピッチ(隣り合う凹部間または凸部間の平均距離)が $100\text{ nm} \sim 1000\text{ nm}$ の範囲内、特に $150\text{ nm} \sim 500\text{ nm}$ の範囲内であることが好ましい。反射防止層とするためには、上述した範囲とすることが好ましいからである。

このような微細な凹凸により反射防止層とした際に用いられる材料としては、透明で可視域に蛍光性を有しない高分子材料が好適である。例えば(メタ)アクリル系樹脂、スチレン系樹脂、シクロオレフィン系樹脂、ポリエステル類、ポリカーボネート類などを挙げることができる。

上記微細な凹凸構造を形成する方法としては、サブトラクティブ法とアディティブ法とに大別することができる。サブトラクティブ法とは、材料のエッチングや選択的除去による方法である。エッチングによるものとしては、例えば酸素プラズマ処理法、サンドブラスト法などがある。選択的除去によるものとしては、上述したポリマーの相分離構造と選択的溶解性を利用する方法とがある。一方、アディティブ法とは、材料を凹凸構造となるように基材上に成膜する方法である。乾式プロセスとしてはスパッタリング法、PVD法、CVD法が挙げられる。湿式プロセスとしては、粒子を含むコーティング液を用いて、吸着法、スプレー法、ディップコーティング法などにより成膜する方法が挙げられる。

一方、微細な多孔質構造として、多孔質層を用いる場合は、連通孔を有し、孔

径が3 nm～90 nmの範囲内、特に5 nm～70 nmの範囲内である材料を用いることができる。

このような材料を形成する方法としては、交互吸着法や粒子沈降法などの微粒子積層体を形成する方法を好適に用いることができる。粒子としては、シリカ粒子やポリマー粒子などの透明な粒子が好ましい。平均粒径は、20 nm～100 nmの範囲内、特に30 nm～80 nmの範囲内が好ましい。また、微粒子積層体を鋳型として多孔質構造を形成することもできる。具体的には、粒子積層体の空隙に低分子材料を浸透させ、その場で反応させることにより自己支持性のある材料にし、その後、粒子を選択的に除去するという方法である。

(光吸収層)

光吸収層は、励起光を吸収する機能を有するものであれば特に限定されるものではないが、光吸収層に達した励起光の吸収率が50%以上、特に90%以上のものが好適に用いられる。

このような光吸収層は、反射防止層と同様に、平坦構造を有するものであっても良く、凹凸構造を有するものであっても良いが、固定化層側に配置される場合には、反射防止層と同様にプローブ生体分子を高密度に集積する観点から微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造を有するものが好ましい。

光吸収層が平坦構造を有する場合、このような光吸収層を形成する方法としては、入射光を吸収する塗料を基材に塗布する方法を挙げることができる。着色ガラスや着色プラスチックをそのまま基板として用いることも可能である。光吸収剤は、試料に標識された蛍光分子からの蛍光スペクトルと光吸収剤からの蛍光スペクトルが互いに重ならず、かつ励起光を吸収する性質を有する材料でなければならない。励起光による光吸収剤からの蛍光が無いのが特に好ましい。このような材料としては、黒鉛、フラーレンなどを挙げることができる。バインダーとしては、一般的なバインダー樹脂を用いることができる。微細な凹凸構造を有する光吸収層を形成する方法としては、着色基板や光吸収層を形成した基板をサンドブラスト法などによりエッチングする方法が挙げられる。また、微細な多孔質構造を有する光吸収層は、酸素プラズマ法などの、バインダー樹脂のみを選択的に除去することができる方法や交互吸着法などにより得ることができる。

(反射層)

本発明においては、上述したように反射機能領域をパターン状に形成することは効果的である。このような反射層を形成する方法ならびに材料としては、所望の開口部を有するメタルマスクを介してアルミニウム、金、銀などの金属や、チタンアルコキシドなどの有機金属を基材上に蒸着する方法が挙げられる。別の方法としては、触媒をパターン状に基材上に付与し、ニッケル、銅、金などを無電解めっきすることにより反射層を形成する方法がある。また、蒸着や無電解めっきなどにより反射層を基板表面に形成した後に、フォトリソグラフィならびにエッチングによって所望のパターンの反射層を得ることもできる（参考文献 特開2002-153272）。

(基板)

本発明に用いられる基板の材料としては、それぞれの用途に応じた要求特性を満たす材料が選択される。具体的には、アルミニウム、銅、ステンレス、亜鉛などの金属、シリコンなどの半導体、ガラスなどの無機物、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン等の高分子物質を主成分とするフィルムなどを挙げることができるが、通常はガラスや高分子材料等の透明材料が用いられる。基板の形状は、スライドガラスのような平坦なもの、マイクロウェルプレートのような独立したウェルが多数形成されたものなどが好適である。

本発明においては反射抑制機能をバイオマイクロアレイ用基板に付与するために、上述のように別途層を設けるのではなく、基板自体が反射抑制機能を有するものであってもよい。例えば、基板表面が、微細な凹凸構造を有するか、または微細な多孔質構造を有する基板等を例示することができる。このような微細な凹凸構造もしくは微細な多孔質構造は、上述した方法により形成することができる。

なお、このような構造は基板の片面に形成されていても良く、両面に形成されていても良いが、片面に形成されている場合には、プローブ生体分子の高集積化の観点から、プローブ生体分子が固定される側に形成されていることが好ましい。

(固定化層)

本発明に用いられる固定化層は、プローブ生体分子を固定化するために基板上に設ける薄膜である。このような固定化層は、例えば、基板表面をアルカリ洗浄

し、リンスすることにより表面をマイナスに帯電させ、これにポリーL-リシンなどの固定化剤を吸着させることにより表面をプラスに帯電させ、遠心機により不要なポリーL-リシンを取り除いて乾燥させることにより形成される。また、基板表面にアミノ基を有する活性分子を化学蒸着する方法もある。活性分子としては、例えばアミノプロピルトリエトキシシランなどを挙げることができる。さらには、アルデヒド基や活性エステル基などを含有する高分子材料の吸着層を形成する方法もある。

なお、固定化層の厚さは、前述のように基板上に凹凸構造の反射防止層または光吸収層が形成される場合や、基板表面自体に凹凸構造を形成することにより、表面積を拡大し、プローブ生体分子を高密度に集積するという目的を損なわない範囲内であることが好ましい。具体的には、平均凹凸深さの $1/3$ 以下または平均孔径の $1/3$ 以下の厚みであることが望ましく、更に望ましくは、単分子層（分子吸着層）級の厚みである。

本発明においては特に、基板上に、少なくとも2種類の異なる表面自由エネルギーを有する領域がパターン状に配置されてなることが好ましい。すなわち、固定化層がパターンニングされており、かつ固定化層と基板表面との表面自由エネルギーが異なるものであることが好ましい。ここで表面自由エネルギーとは、単位面積の表面を作り出すのに必要なエネルギー（ $\text{erg} \cdot \text{cm}^{-2}$ ）をいい、表面分子が受ける内方に引かれる力の指標となるものである。

さらに、そのような異なる表面自由エネルギーを有する領域が、プローブ生体分子との濡れ性が高い第1の表面自由エネルギーを有する独立した複数の領域と、その周囲に配置されたプローブ生体分子との濡れ性が低い第2の表面エネルギーを有する連続した領域とから構成されてなることが好ましい。このように固定化層と基材表面との表面自由エネルギーの差を利用することにより、搭載されたプローブ生体分子の拡散を防止し、より高密度に集積することが可能となると共に、不要なプローブ生体分子の吸着を防止して解析精度を更に高めることができるからである。

このような異なる表面自由エネルギーを有する領域としては、例えば、親水性領域と疎水性領域、帯電している領域と帯電していない領域、プローブ生体分子

との共有結合が可能な領域と共有結合が不可能な領域など種々のパターンが可能である。

このように基板上に異なる表面自由エネルギーを有する領域をパターン状に形成する方法としては、上述のようにポリ－Ｌ－リシン等の固定化剤からなる薄膜を形成した後、光触媒技術、エッチング法またはフォトリソグラフィ法等を用いて所望のパターンを形成する方法等が挙げられる。ここで光触媒技術とは、特開 2002-274077 号公報、特開 2000-249821 号公報等に記載の方法をいう。

また、マイクロコンタクト印刷法、フレキシソ印刷法、グラビア印刷法などの印刷法によっても基板上に異なる表面自由エネルギーを有する領域をパターン状に形成することが可能である。

(位置検知用マーク)

本発明においては特に、基板上に位置検知用マークが形成されてなることが好ましい。すなわち、マイクロアレイ領域と重ならない部分に、プローブをスポットする際や検体を検出する際に基板上の各スポットの座標位置を知るための検知用マークが形成されてなることが好ましい。これは、特にマイクロアレイのスポット位置に応じて異なる試薬を用いる必要のある場合などに有効である。位置検知用マークは、光学的に読取可能なマーク、電気的に読取可能なマーク、磁気的に読取可能なマークなどが考えられるが、光学的に読取可能なマークが望ましい。顕微鏡や画像表示装置を用いた観察が容易だからである。

位置検知用マークの作製方法としては、基板の所定の位置にあらかじめ、印刷法、エッチング法、めっき法などにより位置検知用マークを作製しておく方法、基板上に、少なくとも２種類の異なる表面自由エネルギーを有する領域をパターン状に配置するためのパターン形成工程において位置検知用マークの潜像も同時に形成し、その潜像位置にのみインキを塗布する方法や金属めっきを施す方法などがある。

なお、位置検知用マークは、読取を損なわない限りにおいては、本発明の層構成のうち、どの層上に形成されていても良い。

B. バイオマイクロアレイ

本発明のバイオマイクロアレイは、上述した本発明のバイオマイクロアレイ用基板にプローブ生体分子が結合してなることを特徴とするものである。本発明のバイオマイクロアレイは、反射抑制機能を有するバイオマイクロアレイ用基板を用いることにより、蛍光ラベルのシグナル強度が相対的に高められ、高い解析精度を得ることができる。また、本発明のバイオマイクロアレイは、反射防止層に特定の構造を採用することにより、反射抑制機能のみならずプローブ生体分子を高密度に集積する機能をも付与することができるので、高い感度を得ることができる。さらに、本発明のバイオマイクロアレイは、反射抑制機能と反射機能とがパターン状に形成されたバイオマイクロアレイ用基板を用いることにより、蛍光ラベルのシグナル強度を高めると共に、不要な励起光の反射を抑えることができるので、さらに優れた解析精度を得ることができるなど種々の利点を有するものである。

スポッティング法は、マイクロアレイ用基板上にプローブ生体分子を含む溶液をスポットするためのスポッティング工程と、スポットを固定化するための後処理工程とからなるものである。

スポッティング工程において用いられるプローブ生体分子を含む溶液（または分散液）は、予め調製したものでも良く、プローブ生体分子と溶媒とを別々にスポットし、基板上で調製するのでも良い。プローブ生体分子溶液の濃度は、通常の範囲内であれば特に限定されるものではない。また、プローブ生体分子を溶解するための溶媒は、生体分子に不活性なものであれば良く、用途に応じて適宜選択すれば良い。

マイクロアレイ用基板上に形成されるスポット径は、用途に応じて異なるものではあるが、定量性および解析効率の観点から $50\ \mu\text{m}\phi \sim 400\ \mu\text{m}\phi$ の範囲内であることが好ましい。

後処理工程においては、例えば、スポット形状を整える処理を行った後、UV照射を行うことによりプローブ生体分子をクロスリンクさせてマイクロアレイ用基板との結合を強化する。

次に、後処理溶液に浸漬してプローブ生体分子の非搭載部をマスクする。後処理溶液は用途に応じて適宜選択すれば良い。例えば、無水コハク酸、N-メチル

ピロリジノン、0.2Mホウ酸ナトリウム（pH 8.0）等が挙げられる。続いて、95℃の蒸留水、95%エタノールで洗浄することによりマイクロアレイ用基板上に付着した不要な試料を取り除き、遠心処理し、乾燥させることによりマイクロアレイを得る。

また、マイクロアレイ用基板にプローブ生体分子を結合させる方法としては、上記スポッティング法その他、インクジェット方式やノズル方式等を用いることも可能である。

また、先にも記載したように、生体分子としてはDNAのみならず、RNA、ペプチド、タンパク質、多糖類、細胞または組織などの生体分子などを用いることが可能である。

なお、本発明は、上記実施形態に限定されるものではない。上記実施形態は例示であり、本発明の特許請求の範囲に記載された技術的思想と実質的に同一な構成を有し、同様な作用効果を奏するものは、いかなるものであっても本発明の技術的範囲に包含される。

EXAMPLES

以下に実施例を示して、本発明を更に具体的に説明する。

〔実施例1〕

（基材への反射防止層の形成）

まず、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド（PDDA、アルドリッチ製、分子量40～50万）の0.4%溶液と、シリカ粒子分散液（日産化学製、MP-1040）、イオン交換水を用意した。市販のスライドガラスを洗浄後、2分間PDDA溶液に浸してPDDAをスライドガラスに吸着させた。次いで、不要なPDDAを除去するためにイオン交換水で2分間洗浄した。次に、反射防止層を形成するためPDDAを吸着させたスライドガラスをMP-1040に1分間浸した。シリカ粒子を吸着させた後、pH 10に調製したイオン交換水で4分間洗浄した。この操作により、スライドガラスの両面に微粒子層からなる凹凸を有する反射防止層を形成することができた。

（反射防止層付き基材への固定化層の形成）

上記反射防止層付き基材をポリ-L-リシン（和光純薬製）の0.1%溶液に5分間浸し、次いでイオン交換水で2分間洗浄した。この操作により、分子層レベルのポリ-L-リシンからなる固定化層を形成することができた。これら一連の操作によりマイクロアレイ用基板を得ることができた。

[実施例2]

（基材への反射防止層の形成）

ポリアリルアミン塩酸塩（PAH、アルドリッチ製）とポリアクリル酸（PAA、アルドリッチ製）の0.4%溶液とイオン交換水を用意した。PAH溶液とPAA溶液はそれぞれpH7.8～pH8.5、pH3.5に調製した。市販のスライドガラスを洗浄後、交互吸着性によりPAH/PAAの10周期（PAHの吸着を10回、PAAの吸着を10回）の交互吸着膜を作製した。これを酸処理することにより多孔質構造／凹凸構造として反射防止能を付与し、その後熱処理してPAHとPAAをアミド結合により架橋させ反射防止構造を固定した。これら一連の操作はHillerら、Nature Materials, 第1巻、59ページ、2002年によった。

（反射防止層付き基材への固定化層の形成）

上記反射防止層付き基材にポリ-L-リシンを溶液からディップコートし、不要な溶液を遠心分離により除去し、固定化層を形成した。これら一連の操作により、マイクロアレイ用基板を作ることができた。

[実施例3]

（基材への反射防止層の形成）

上記実施例1と同様にした。

（反射防止層付き基材への固定化層の形成）

3-アミノプロピルトリエトキシシラン（アクロス製）を用い、化学蒸着法により、反射防止層として用いたシリカ粒子表面上にアミノ基含有層を形成した。これら一連の操作により、マイクロアレイ用基板を作ることができた。

[実施例4]

実施例3で作製したマイクロアレイ用基板を300 μm ϕ 、ピッチ600 μm の遮光部が形成された石英クロムマスク越しに真空紫外線を照射し、生体分子を

搭載する部分以外の有機物を除去した。有機物が除去された部分は、シリカに類似した表面となった。これにより、アミノ基含有部が $300\mu\text{m}\phi$ 、ピッチ $600\mu\text{m}$ で形成されたマイクロアレイ用基板を作ることができた。

〔実施例5〕

実施例4で作製したパターン化マイクロアレイ用基板を用い、オクタデシルトリメトキシシラン（ODS）を化学蒸着させ、その後、シクロヘキサンで基板を十分洗浄し、アミノ基含有パターン上に物理吸着したODSを除去した。これら一連の操作により反射防止層上に、オクタデシル基で周辺部がマスクされたアミノ基含有パターンアレイを有するマイクロアレイ用基板を作ることができた。

〔実施例6〕

（基材への反射防止層の形成）

まず、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド（PDDA、アルドリッチ製、分子量40～50万）の0.4%溶液と、ポリマー粒子分散液（JSR製、AE137）、イオン交換水を用意した。市販のスライドガラスを洗浄後、2分間PDDA溶液に浸してPDDAをスライドガラスに吸着させた。次いで、不要なPDDAを除去するためにイオン交換水で2分間洗浄した。次に、反射防止層を形成するためPDDAを吸着させたスライドガラスをAE137に2分間浸した。ポリマー粒子を吸着させた後、イオン交換水で4分間洗浄した。乾燥後、試料を60℃で30分間熱処理し、粒子の基板への付着力を高めた。この一連の操作により、スライドガラスの両面にポリマー微粒子層からなる凹凸を有する反射防止層を形成することができた。

（反射防止層付き基材への固定化層の形成）

上記反射防止層付き基材にポリ-L-リシンを溶液からディップコートし、不要な溶液を遠心分離により除去し、固定化層を形成した。これら一連の操作により、マイクロアレイ用基板を作ることができた。

〔実施例7〕

（基材への反射防止層の形成）

まず、ポリジアリルジメチルアンモニウムクロライド（PDDA、アルドリッチ製、分子量40～50万）の0.4%溶液と、2種のシリカ粒子分散液（日産

化学製、スノーテックス40およびスノーテックス20L)、イオン交換水を用意した。市販のスライドガラスを洗浄後、PDDAの吸着・洗浄、スノーテックス40の吸着・洗浄、次いでPDDAの吸着・洗浄とスノーテックス20Lの吸着・洗浄を3セット（最表面はシリカ層）を行い、PDDAを接着剤とした微粒子の積層構造からなる多孔質の反射防止層を形成した。

（反射防止層付き基材への固定化層の形成）

3-アミノプロピルトリエトキシシラン（アクロス製）を用い、化学蒸着法により、反射防止層として用いたシリカ粒子表面上にアミノ基含有層を形成した。これら一連の操作により、マイクロアレイ用基板を作ることができた。

〔実施例8〕

（光吸収層付き基材への反射防止層の形成）

基板として、裏面に黒色のテープが貼り付けられたスライドガラスを用い、実施例1に準じた方法で基板の表面にのみ反射防止層を形成した。

（光吸収層と反射防止層付き基材への固定化層用パターンおよび位置検知用マークの潜像の形成）

まず、ODSを化学蒸着し、反射防止層上にオクタデシル層含有層を形成した。次いで、マイクロアレイ用パターンとして非遮光部が $200\mu\text{m}\phi$ 、ピッチ $500\mu\text{m}$ で形成され、かつ、位置検知用マークのパターンとして幅 $50\mu\text{m}$ 、長さ 2mm のラインが中点で互いに直角に交差した形状の非遮光部が形成されたクロムマスクを用い、実施例4と同様の真空紫外線処理を施した。

（位置検知用マークの形成）

上記工程において形成された潜像上に銀コロイドインキの微小滴を載せ、その後、余分なインキを吸い取ることにより、潜像上にのみ銀コロイドインキが残った。それを乾燥させることにより、金属光沢を有する位置検知用マークを形成することができた。

（上記工程を経た基材へのパターン化固定化層の形成）

位置検知用マークを形成した基板に対し、3-アミノプロピルトリエトキシシランを化学蒸着し、ODSが除去された部分に、すなわち、 $200\mu\text{m}\phi$ 、ピッチ $500\mu\text{m}$ で固定化層としてのアミノ基含有層を反射防止層上に形成した。こ

れら一連の工程により、光吸収層を裏面に反射防止層を表面に有する基材上に位置検知用マークとパターン化固定化層が形成されたマイクロアレイ用基板を作製することができた。

WHAT IS CLAIMED IS:

1. 反射抑制機能を有することを特徴とするバイオマイクロアレイ用基板。
2. 基板表面に、反射防止層および光吸収層の少なくとも一方を形成することにより、前記反射抑制機能を有するようにしたことを特徴とする請求の範囲第1項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
3. 前記反射防止層および光吸収層の少なくとも一方が、パターン状に形成されていることを特徴とする請求の範囲第2項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
4. 基板表面に、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することを特徴とする請求の範囲第1項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
5. 前記反射防止層が、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することを特徴とする請求の範囲第2項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
6. 前記光吸収層が、微細な凹凸構造または微細な多孔質構造を有することを特徴とする請求の範囲第2項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
7. 基板上に、プローブ生体分子を固定化するための固定化層がパターン状に形成されていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
8. 基板上に、位置検知用マークが形成されていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載のバイオマイクロアレイ用基板。
9. 請求の範囲第1項に記載のバイオマイクロアレイ用基板にプローブ生体分子が固定化されていることを特徴とするバイオマイクロアレイ。

ABSTRACT OF THE DISCLOSURE

本発明は、バイオマイクロアレイを用いた種々の解析の精度を向上させるために、蛍光分子のシグナル強度を相対的に高めることができ、また、定量性を向上させることのできるバイオマイクロアレイおよびそれに用いるバイオマイクロアレイ用基板を提供することを主目的とする。

本発明は、反射抑制機能を有することを特徴とするバイオマイクロアレイ用基板を提供することにより上記目的を達成するものである。